

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 12 January 2001 (12.01.01)	
Applicant's or agent's file reference GP00-1007	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JPO/04440	International filing date (day/month/year) 03 July 2000 (03.07.00)

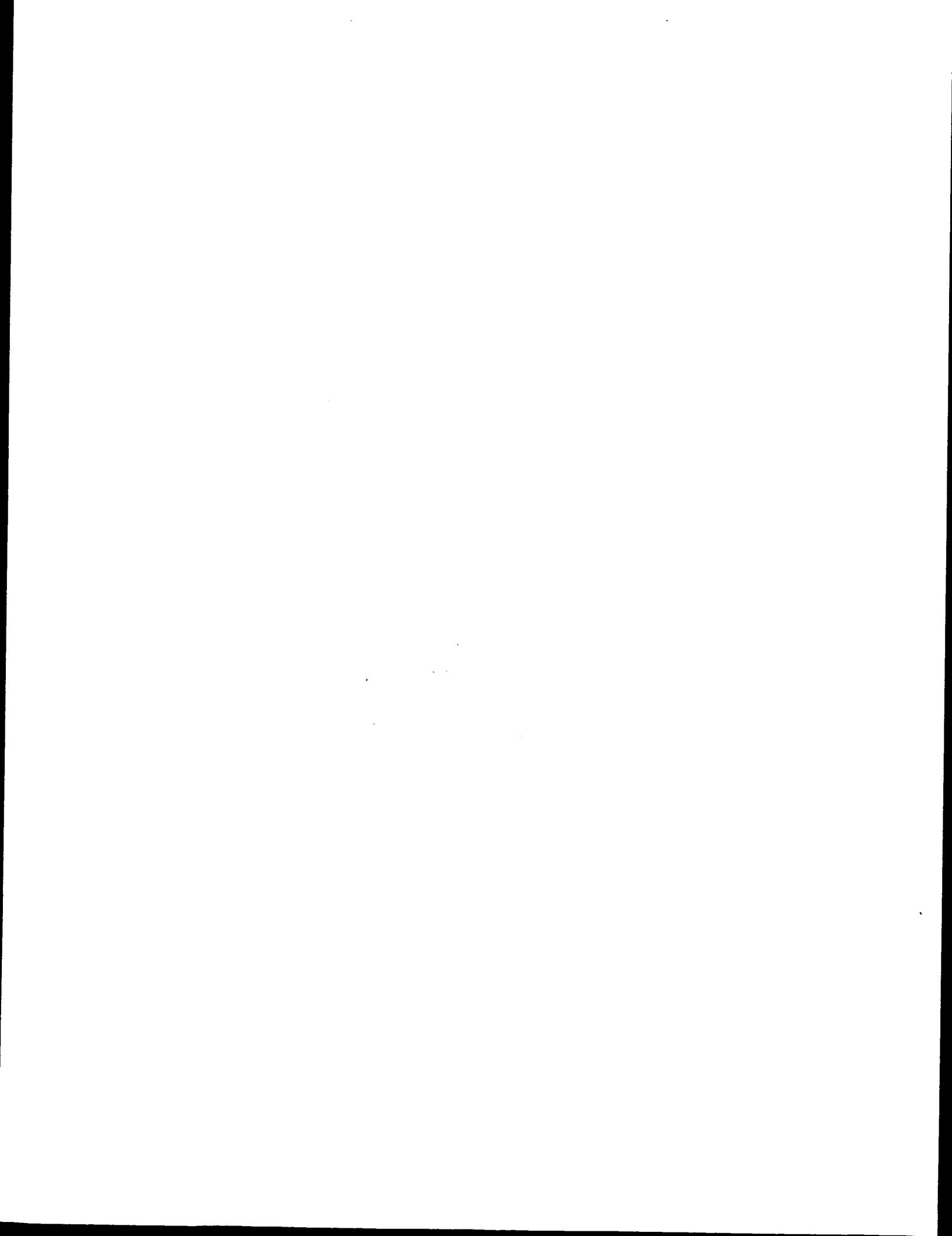
From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHOJI, Takashi
6F, SN Iwamotocho Bldg.
2-10, Iwamotocho 3-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032
JAPON

1. The following indications appeared on record concerning: <input type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input checked="" type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address 1) SHOJI, Takashi 2) OSHIMA, Yumiko 1F, Dai-ichi Seno Bldg. 9-9, Iwamotocho 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 03-3864-6572	
	Facsimile No. 03-3864-6573	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address 1) SHOJI, Takashi 2) OSHIMA, Yumiko 6F, SN Iwamotocho Bldg. 2-10, Iwamotocho 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 03-3864-6572	
	Facsimile No. 03-3864-6573	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Shinji IGARASHI Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHOJI, Takashi
6F, SN Iwamotocho Bldg.
2-10, Iwamotocho 3-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 19 November 2001 (19.11.01)	
Applicant's or agent's file reference GP00-1007	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/04440	International filing date (day/month/year) 03 July 2000 (03.07.00)
Applicant INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,CA,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

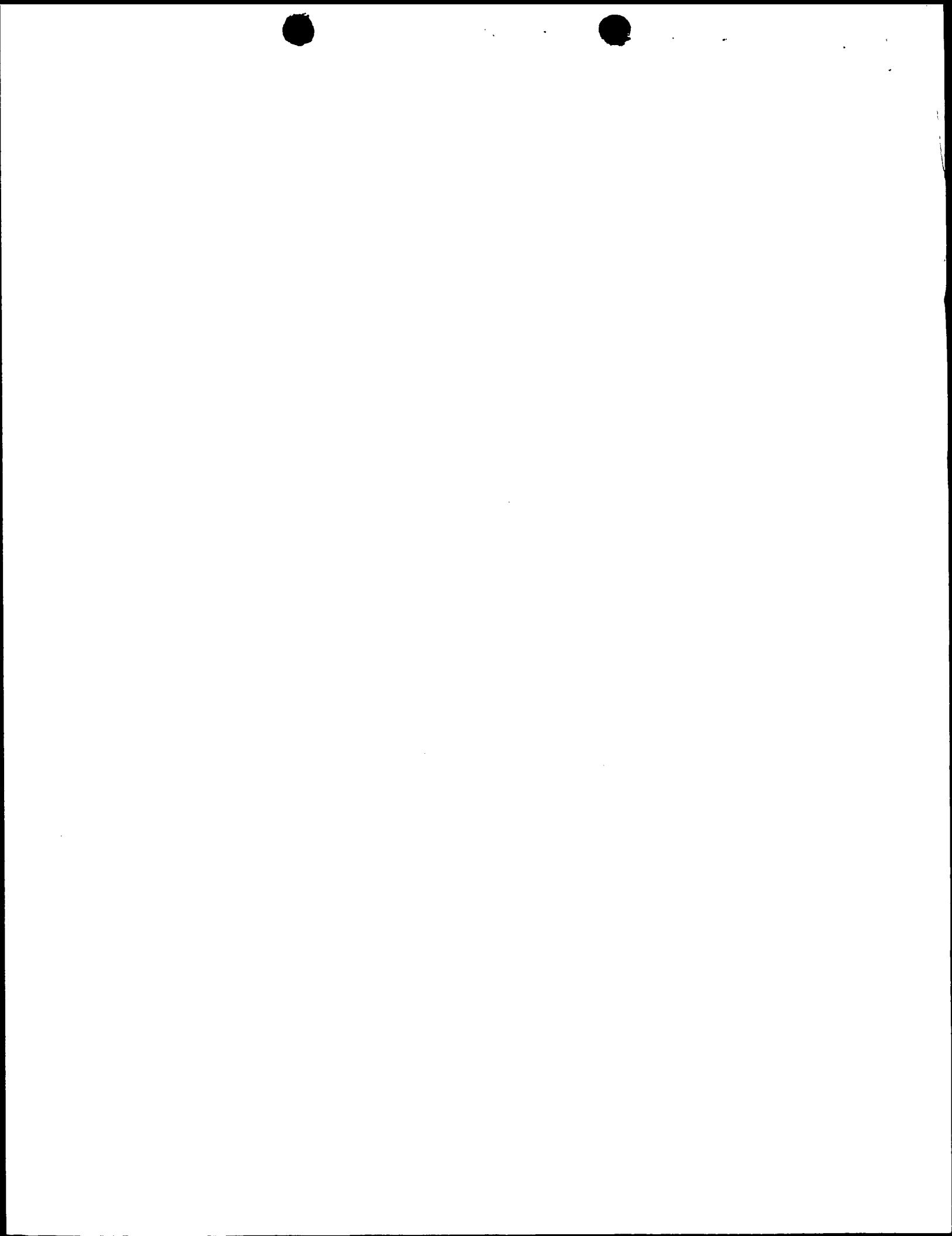
JP,KR

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Elliott PERETTI Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference GP00-1007	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04440	International filing date (day/month/year) 03 July 2000 (03.07.00)	Priority date (day/month/year) 01 July 1999 (01.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/805, G01N 33/72, A61K 38/42		
Applicant INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

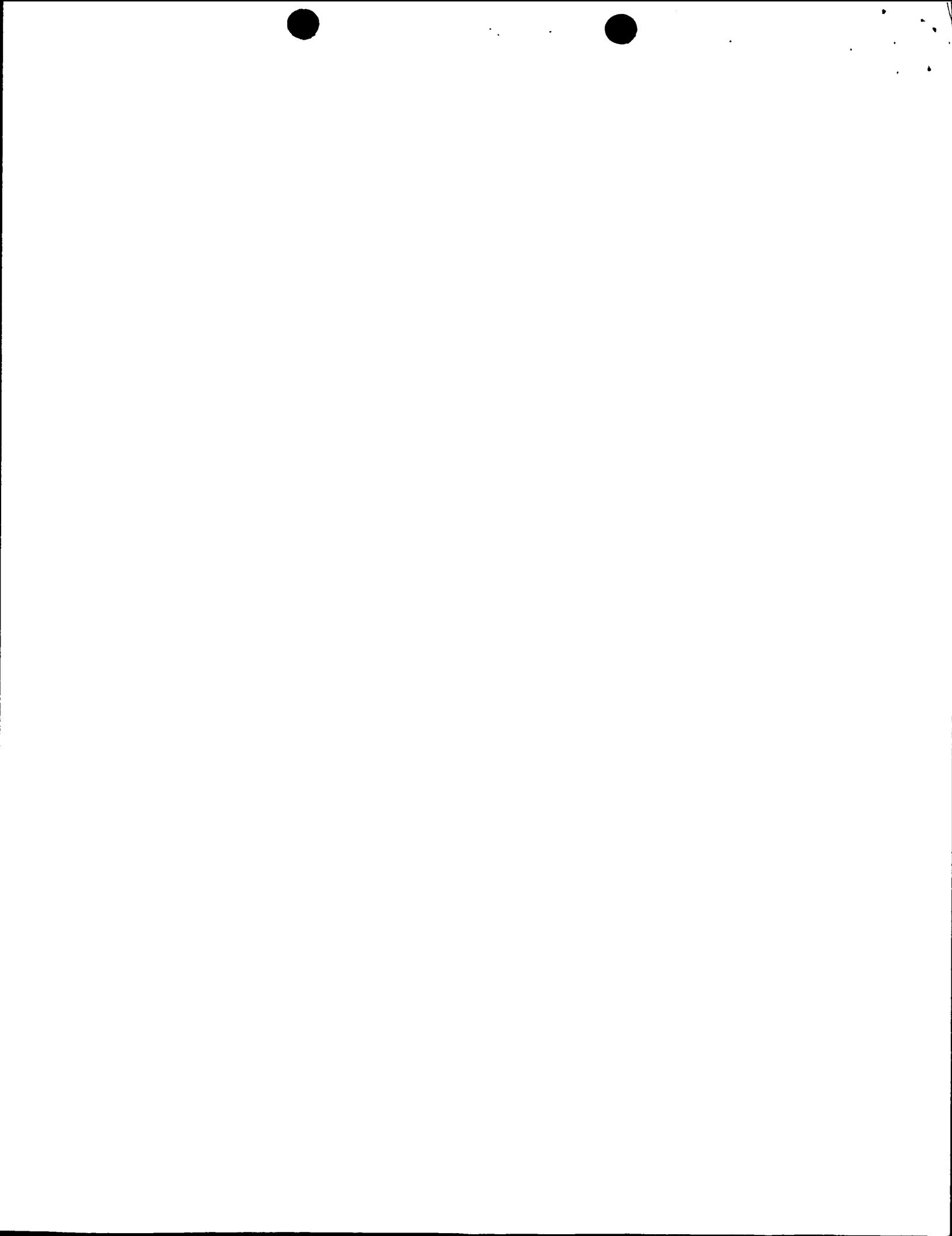
This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 December 2000 (22.12.00)	Date of completion of this report 09 May 2001 (09.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04440

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:^{*} the international application as originally filed the description:

pages _____ 1-3,5-9 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____ 4 _____, filed with the letter of 09 April 2001 (09.04.2001)

 the claims:

pages _____ 2,3,6-12 _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages _____ 1,4,5 _____, filed with the letter of 09.04.01

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

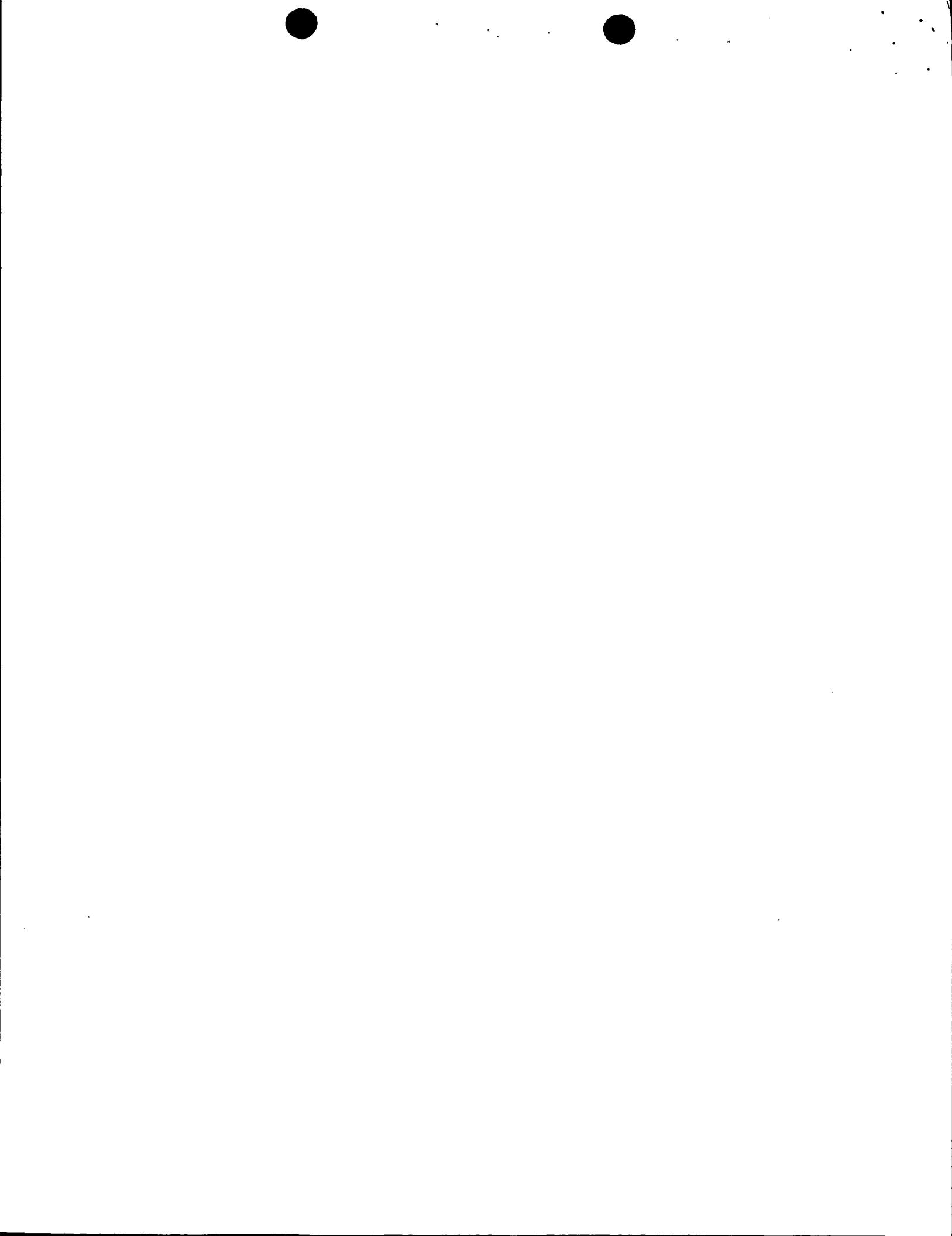
 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).^{**}

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/04440

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

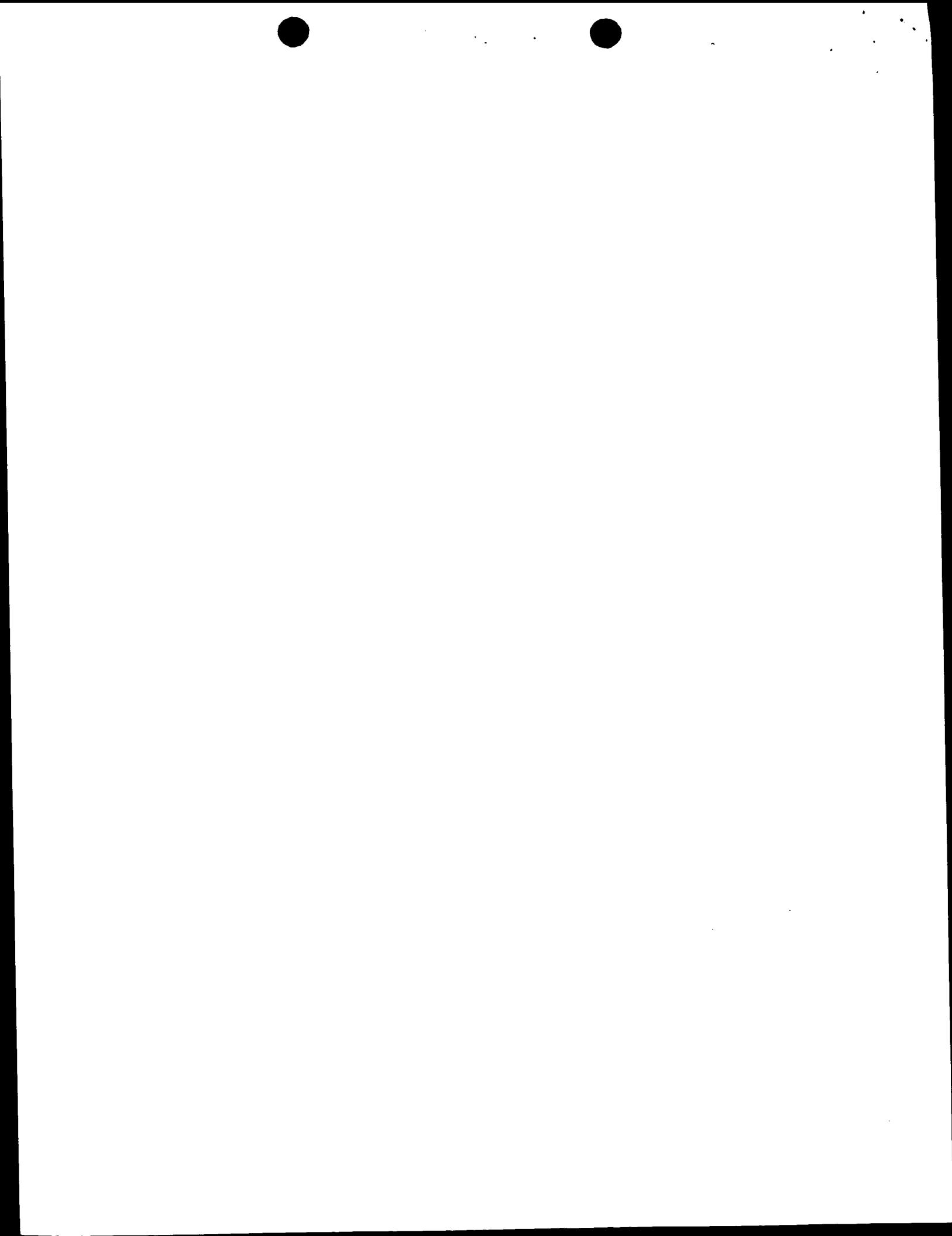
2. Citations and explanations

Claim 1

Document 1 cited in the international search report (WO, 90/11527, A (Bionostics Inc.), 4 October 1990 (04.10.90), page 4, upper right column, lines 4-9, discloses the addition of a sulphur-containing compound in the presence of a metal ion catalyst as a methaemoglobin reduction system for stabilizing haemoglobin in the liquid state; however, it does not disclose or suggest the possibility of preventing oxidation of haemoglobin by the presence of a sulphur-containing compound alone without including a metal ion catalyst source. Therefore, the invention disclosed in Claim 1 is novel and involves an inventive step.

Claims 2-12

The inventions described in Claims 2-8, which technically delimit the invention described in Claim 1 and describe embodiments thereof, are novel and involve an inventive step for the same reasons as given for the invention described in Claim 1.



特許・協力条約

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 GP00-1007	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04440	国際出願日 (日.月.年) 03.07.00	優先日 (日.月.年) 01.07.99
出願人(氏名又は名称) 国際試薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

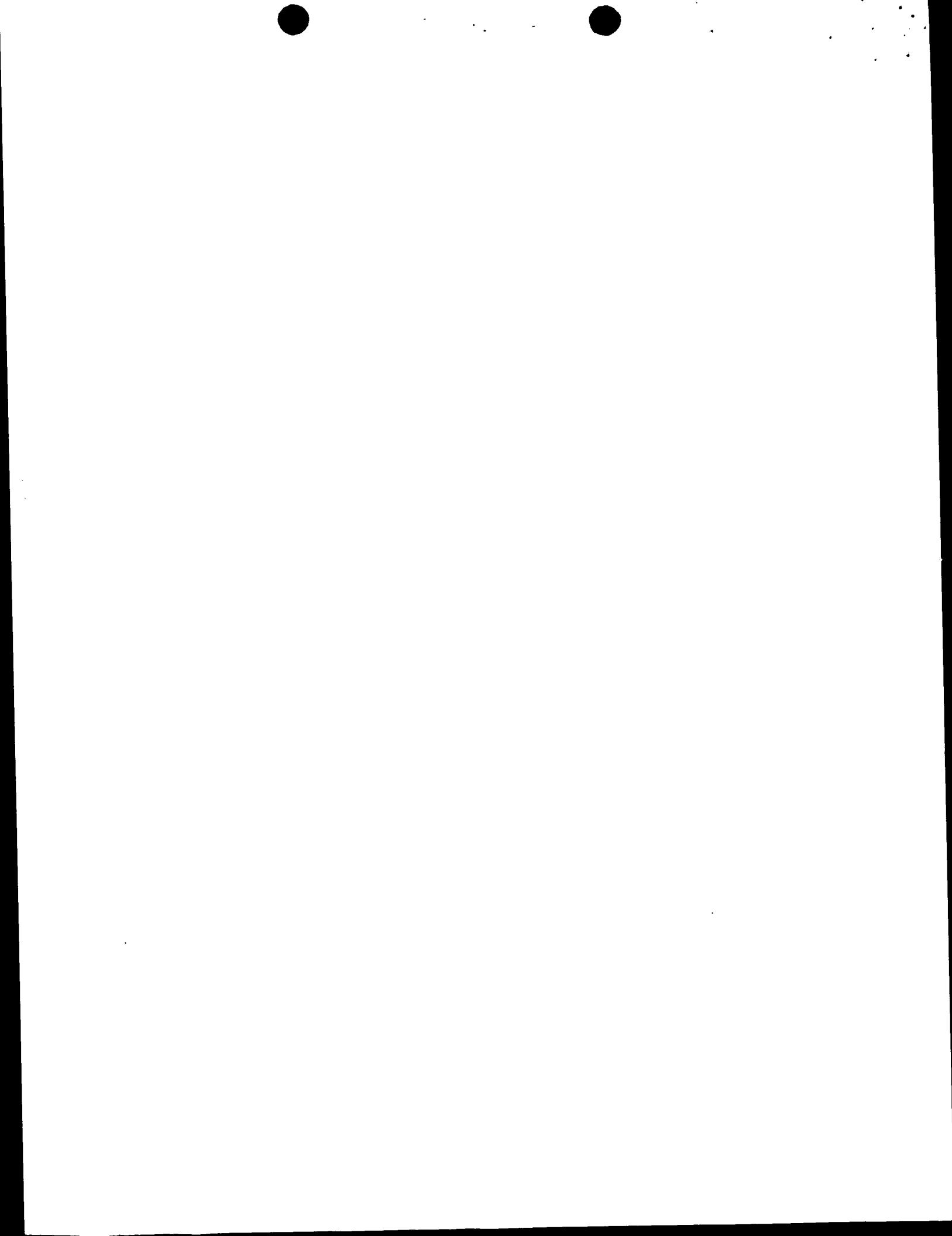
 この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、スクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。3. 発明の单一性が欠如している(第II欄参照)。4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。 次に示すように国際調査機関が作成した。5. 要約は 出願人が提出したものと承認する。 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。 なし 出願人は図を示さなかった。 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.C17 C07K14/805, G01N33/72, A61K38/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.C17 C07K14/805, C07K1/00~1/02, G01N33/72, A61K38/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 90/11527, A (BIONOSTICS INC) 4日. 10月. 1 990 (04. 10. 90) &US, 5045529, A&EP, 465510, A1&DE, 69016415, E&JP, 4-5 04306, A	1-12
A	JP, 8-245421, A (国際試薬株式会社) 24日. 9月. 1996 (24. 09. 96) (ファミリーなし)	1-12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.09.00

国際調査報告の発送日

10.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鈴木 恵理子



4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



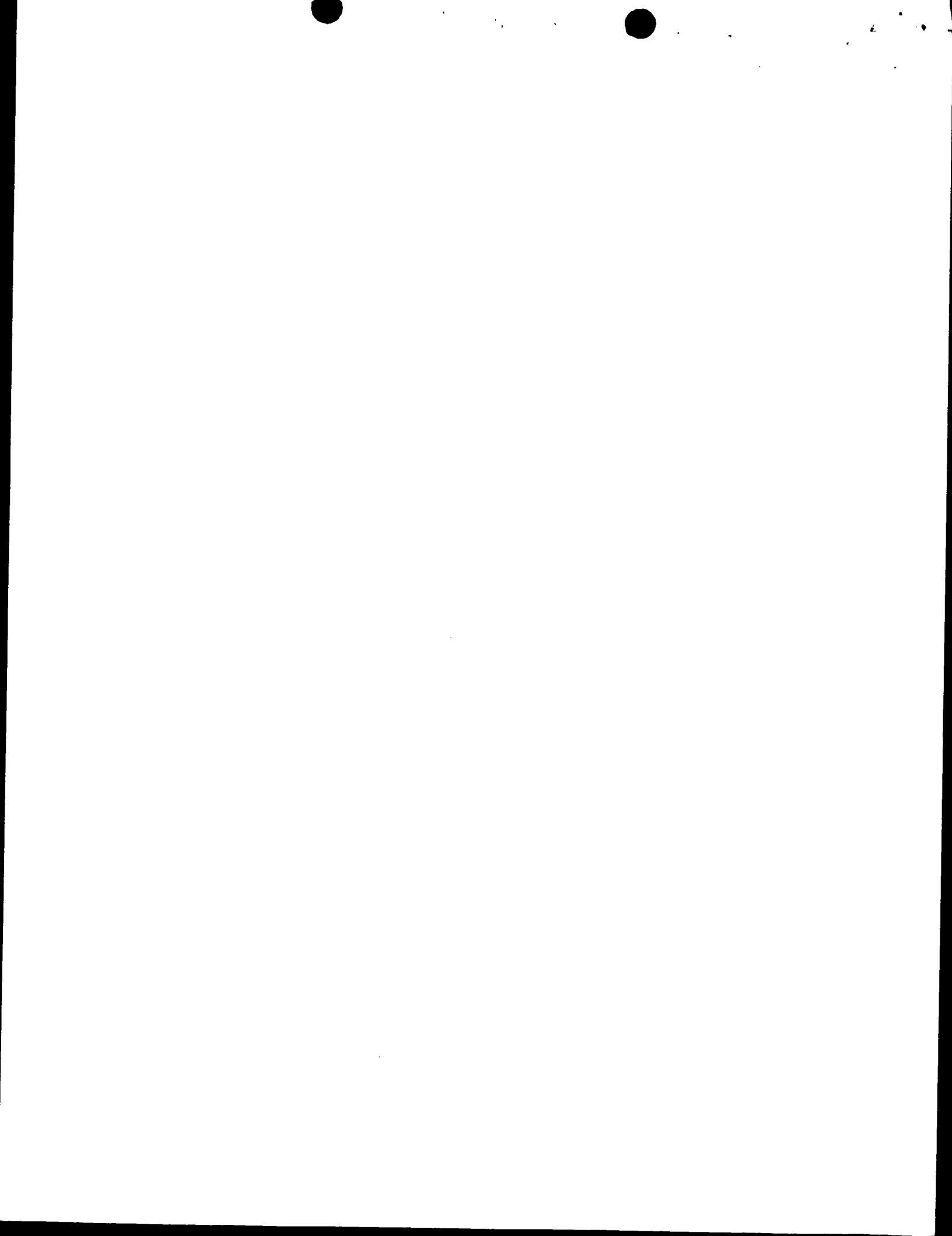
Amendment under PCT 34 article

Best Mode for carrying out the Present Invention

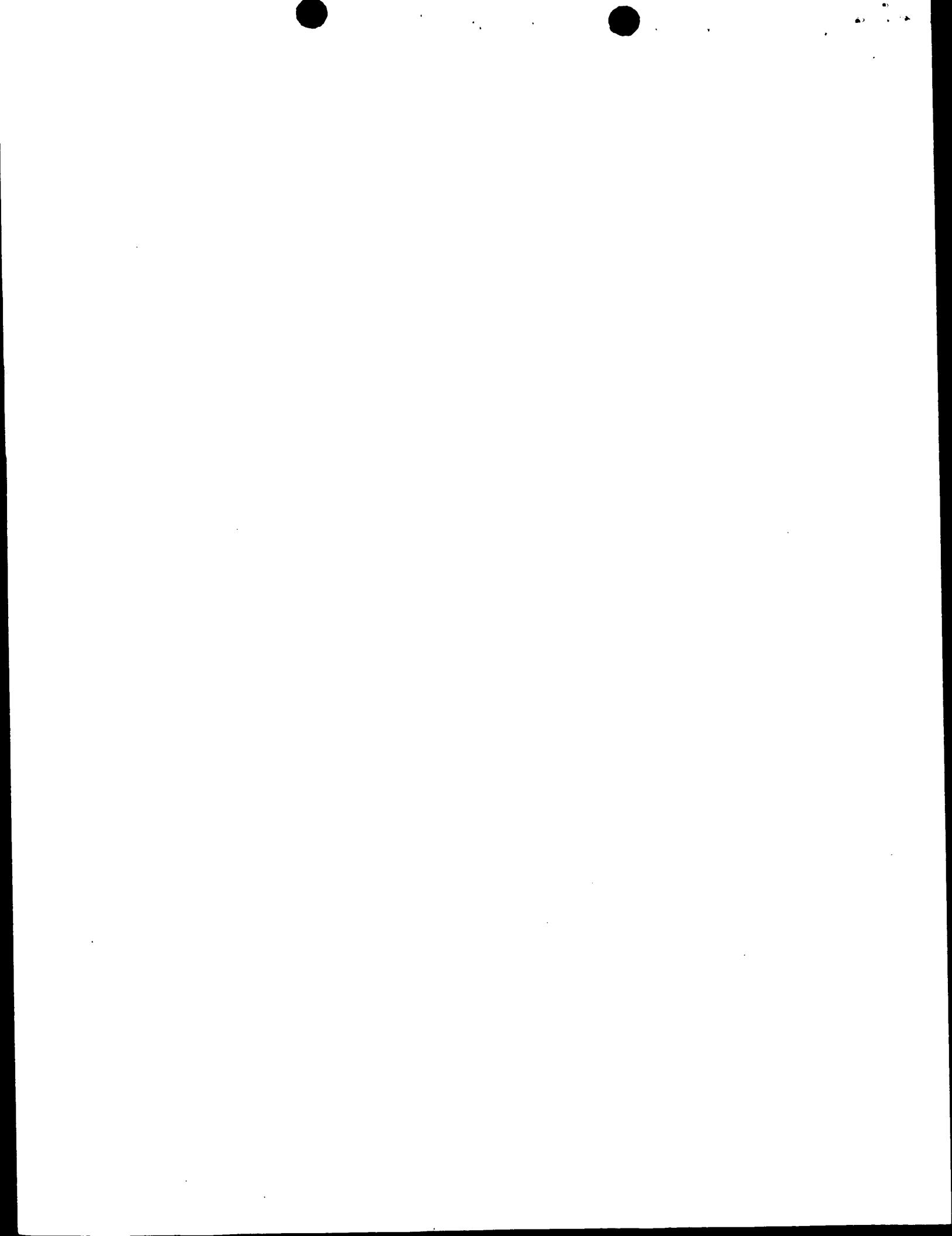
According to the present invention, the hemoglobin mean hemoglobin and glycated hemoglobin. An example of the glycated hemoglobin includes HbA_{1c}. And another example of the hemoglobin includes HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbF, HbA₀, HbA₂, oxyhemoglobin, carbonylhemoglobin, alkali modified hemoglobin, and the like, and other heterohemoglobin. Besides these, modified hemoglobin, such as phosphate ester derivatives of hemoglobin, hemoglobin-polyalkylene conjugates, hemoglobin-inuren conjugates, and hemoglobin-haptoglobin complexes, are also included in the present invention. Further, the hemoglobin of the present invention may be available not only in human origin, but also animal origin, for example, cow, pig, sheep, horse, dog, monkey, rabbit, chicken, and the like. These are used as a standard or control material for various clinic laboratory test. A product offered to these purposes is preferably supplied in a dried substance, as a lyophilized agent, and may be in a form of dried agent, liquid agent, etc., if desired.

The first and principal gist of a stabilizing method and stabilizing agent for hemoglobin according to the present invention, resides in insuring a stability of the hemoglobin in a liquid state. It is meant by securing stability of the hemoglobin in dried remedy and in a state of solution.

A stabilizing method for the hemoglobin according to the present invention is to incorporate sulfur containing compound to stabilize thereof. Addition of the sulfur containing compound is more convenient to add in a process for preparing agent, however, may be attained by conventionally adding after dissolving the agent, on demand. The hemoglobin standard material and control material, in which the hemoglobin is the main ingredient and the sulfur containing compound is contained as a stabilizing agent, are provided, on adding the sulfur



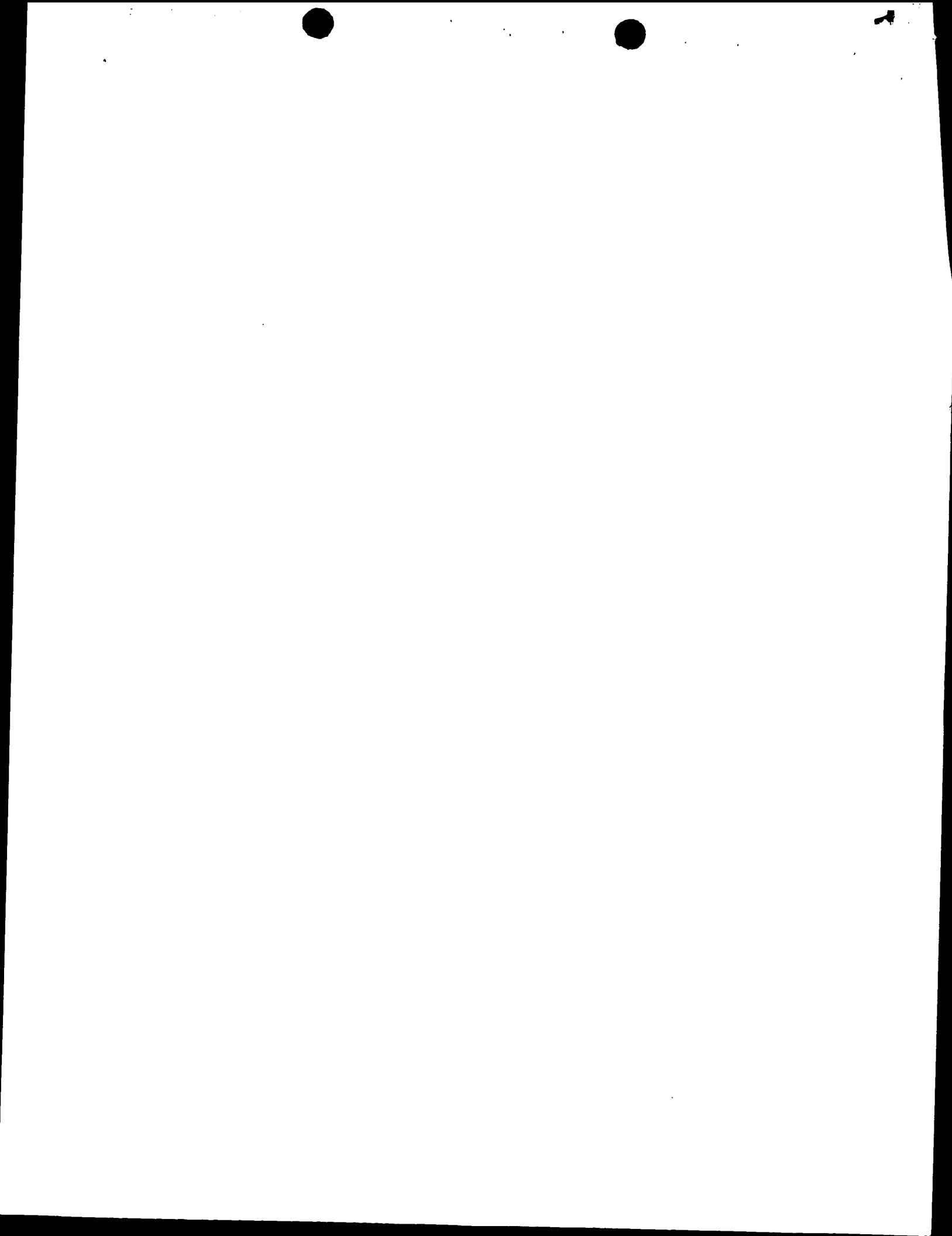
containing agent in a step for preparing agent. If the agent is to be the type, of which the compound is added on demand, the main ingredient and the stabilizing agent containing sulfur containing agent are separately prepared.



Claim amendment under PCT 34

Scope of claims

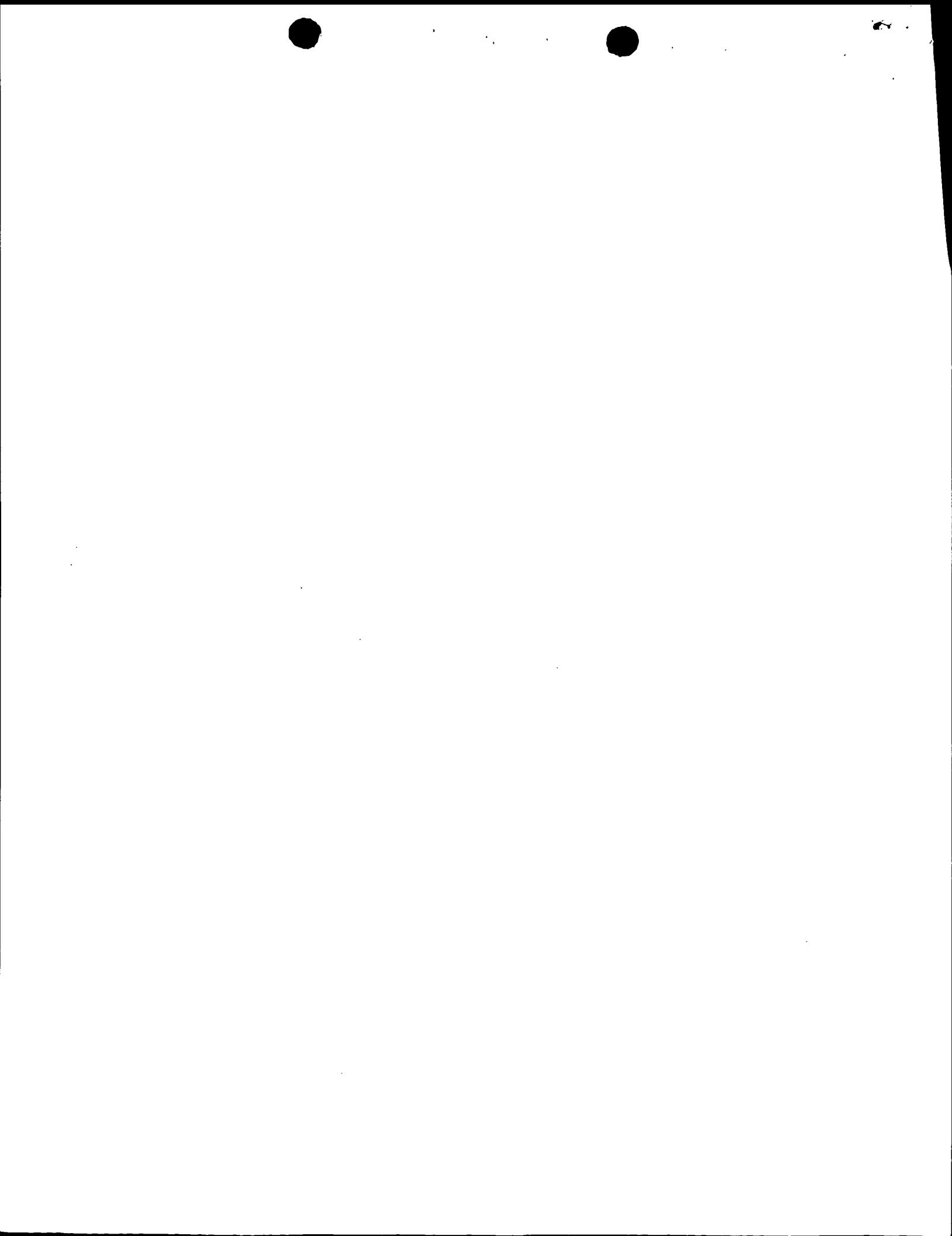
1. (After amendment) Under the condition without incorporating at least metal ionic catalyzer, a stabilizing agent of hemoglobin characterized in that a sulfur containing compound is used in an effective amount to be functioned as a stabilizing agent of the hemoglobin.
2. The stabilizing agent for hemoglobin according to claim 1, wherein characterized by stabilizing hemoglobin in a state of solution.
3. The stabilizing agent for hemoglobin according to claim 1 or 2, wherein said sulfur containing material is compound with SH group.
4. (After amendment) The stabilizing agent according to claim 3, wherein said compound with SH group is one or more compound selected from the group consisting of sulfur containing amino acid, such as cysteine, methionine, cystine, etc., or family thereof, sulfur containing compound, such as thiobenzoic acid, thioglycol acid, 1-thioglycelin, thiodiglycol, mercaptoethanol, glutathione, thioglycerol, etc., or family thereof
5. (After amendment) The stabilizing agent according to claim 3, wherein said compound with SH group is cysteine or family thereof.
6. The stabilizing agent for hemoglobin according to any of claim 1 to 5, wherein said sulfur containing compound is added in an amount of 0.01 to 0.0001 parts by weight per 1 part by weight of hemoglobin.
7. The stabilizing agent for hemoglobin according to any of claim 1 to 6, wherein said hemoglobin are hemoglobin.
8. The stabilizing agent for hemoglobin according to any of claim 1 to 6, wherein said hemoglobin are glycated hemoglobin.
9. The method for stabilizing hemoglobin, wherein characterized by adding the stabilizing agent for hemoglobin according to any of claim 1 to 8.
- 10.A composition containing hemoglobin, characterized by incorporating the stabilizing agent according to any of claim 1



to 8.

11. A kit which comprises at least one of the stabilizing agent according to any of claims 1 to 8 and hemoglobin.

12. Use of sulfur containing compound in stabilizing agent for hemoglobin according to any of claims 1 to 8.



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/02438 A1

(51) 国際特許分類 ⁷ :	C07K 14/805,	(KAKUYAMA, Tsutomu) [JP/JP]; 〒651-2241 兵庫県 神戸市西区室谷1丁目1番2号 国際試薬株式会社 研 究開発センター内 Hyogo (JP).
(21) 国際出願番号:	PCT/JP00/04440	
(22) 国際出願日:	2000年7月3日 (03.07.2000)	(74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒101- 0032 東京都千代田区岩本町3丁目9番9号 第一瀬野ビ ル1階 Tokyo (JP).
(25) 国際出願の言語:	日本語	
(26) 国際公開の言語:	日本語	(81) 指定国(国内): CA, JP, KR, US.
(30) 優先権データ: 特願平11/188132	1999年7月1日 (01.07.1999) JP	(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国際
試薬株式会社 (INTERNATIONAL REAGENTS COR-
PORATION) [JP/JP]; 〒651-0083 兵庫県神戸市中央区
浜辺通2丁目1番30号 Hyogo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 角山 功

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

(54) Title: MEANS OF STABILIZING HEMOGLOBINS

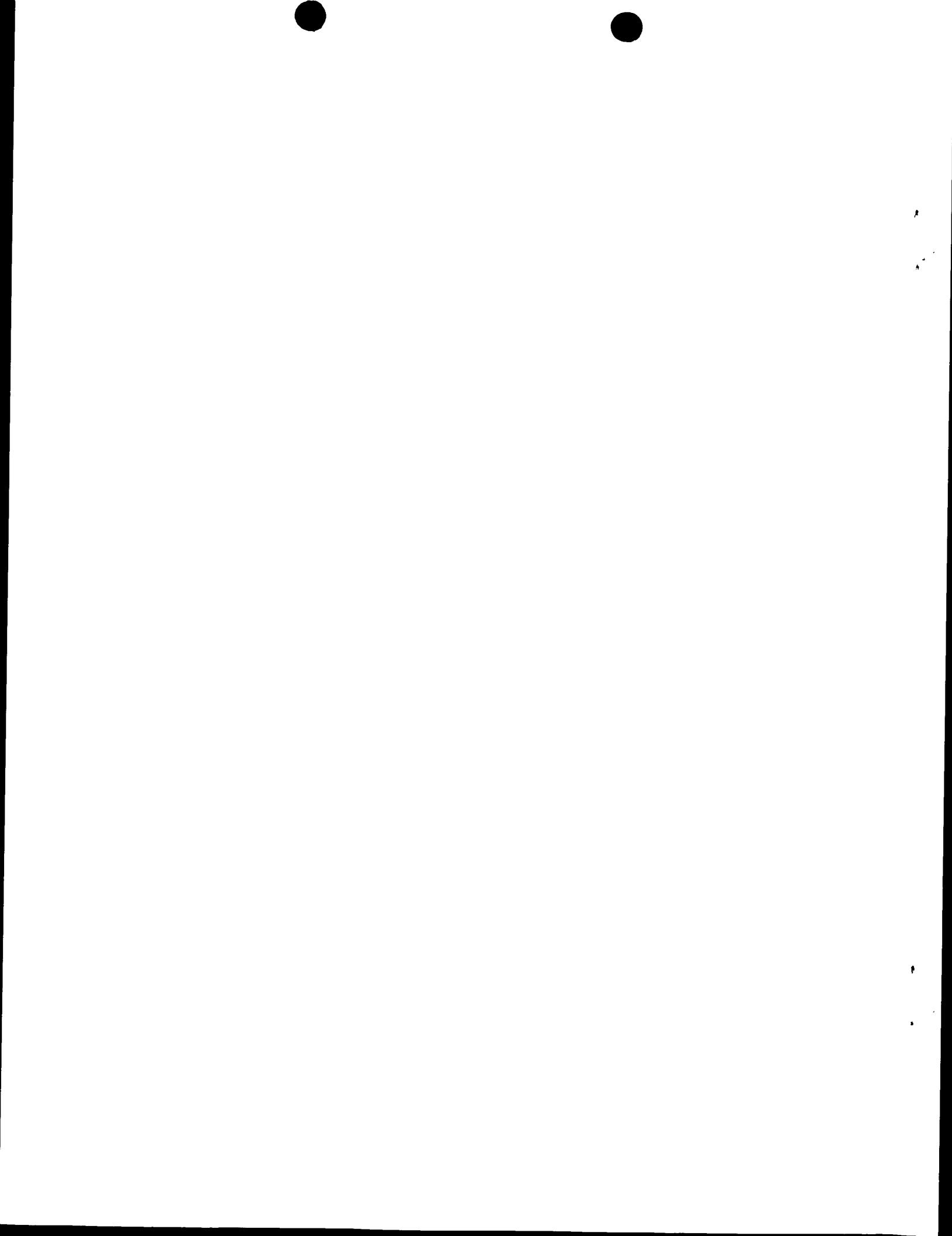
(54) 発明の名称: ヘモグロビン安定化手段

(57) Abstract: Hemoglobin stabilizers characterized by containing a sulfur-containing compound; and a method for stabilizing hemoglobins by adding these stabilizers. The above stabilizers and method are particularly useful in stabilizing hemoglobins in the form of solutions. By using these stabilizers or method, hemoglobin-containing controls, standards, etc. for clinical examinations, which should be measured at a high accuracy, can be stabilized.

(57) 要約:

本発明は含硫化合物を含有することを特徴とするヘモグロビン類の安定化剤、
および該安定化剤を添加するヘモグロビンの安定化方法、特に溶液状態でのヘモ
グロビン類を安定化する安定化剤および安定化方法を提供するものであり、これ
により高精度で測定する必要のある臨床検査用のヘモグロビン類を含むコントロ
ール物質および標準物質などの安定化を達成した。

WO 01/02438 A1



明細書

ヘモグロビン安定化手段

技術分野

5 本発明は、ヘモグロビン類の安定化方法、安定化剤、および安定化されたヘモグロビン類を含む組成物に関するものである。

背景技術

10 ヘモグロビンは、赤血球に存在するヘムタンパク質であり、 α 鎖および β 鎖と命名されるポリペプチド鎖（各鎖はヘム1分子と結合している）2対からなる四量体で構成されており、分子量65,000である。ヘモグロビンは、血液中に成人男性で16～18g/dL、女性で14～16g/dL含まれており、可逆的に酸素を鉄分子に脱着することにより、生体中において酸素運搬機能を果たしている。

15 このような役割を有することから、臨床検査において、ヘモグロビンの測定は基本的な測定項目の一つとなっており、赤血球数やヘマトクリット値などと組み合わせて貧血（例えば、鉄欠乏性貧血、再生不良性貧血、溶血性貧血など）の診断に利用されている。また、最近では、便に含まれている微量のヘモグロビンを測定することにより、大腸ガンなどの診断にも利用されている。

20 一方、グリコヘモグロビンは、ヘモグロビンとグルコースとの非酵素的反応より生じる。血中のグリコヘモグロビンの測定は過去3～4週間の血糖コントロールを反映し、食事に影響されない長期の血糖コントロールの指標として極めて有用である。以後このヘモグロビンとグリコヘモグロビンを合わせてヘモグロビン類と称する。

25 現在、臨床検査の現場では上記ヘモグロビン類の測定は、HPLC法、免疫学的方法、アフィニティ法、電気泳動法、等電点分画法、TBA (2-thiobarbituric acid)

法、RIA (Radio Immuno Assay) 法、Photic acide 法、furo sine 測定法などにより行われている。

上記ヘモグロビン類の測定に際しては、基準となる標準物質やコントロール物質が必要となる。しかし、ヘモグロビン類は不安定な物質であり、酸化により、

5 ヘム鉄が Fe^{2+} から Fe^{3+} となり、鮮赤色から暗褐色のメトヘモグロビンになつて、酸素結合能を失う。更にヘモグロビンは空気中にさらしておくだけでもメトヘモグロビンに酸化され、更には凍結乾燥することでもメトヘモグロビンに酸化されることが知られている。

このような酸化を防止する方法として、 O_2 が結合する部位に CO や NO または CN などの酸素とほとんど大きさの等しい二分子原子を結合させる方法や、凍結乾燥時にアジ化ナトリウムを添加して行う方法がある。しかし上記方法は、操作が煩雑であったり、一部の測定法で顕著な低値を与えることにより測定が不能であったり、更にアジ化ナトリウムが有する毒性のため廃棄の問題などがある。また、含窒素化合物を添加する方法（特開昭 60-35270 号公報）が開示されている

15 ものの、ヘモグロビンからの鉄の遊離を防ぐ効果が開示されているのみである。

糖類およびアミノ酸類を含有させる方法（特開昭 61-1620 号公報）はヘモグロビンのメト化防止剤を開示しているが、この方法は代用血液として利用するヘモグロビンの安定化を目的としており、ヘモグロビンとして mg/mL レベルの濃度を対照としたものであり、臨床検査における標準物質またはコントロール物質などに要求される $\text{ng} \sim \mu\text{g}/\text{mL}$ レベルのヘモグロビンを安定化するには適当ではない。また、アミノ酸およびアルブミンを含有させる方法（特開平 8-245421 号公報）によりヘモグロビン類を安定化させる方法があるが、これは、アミノ酸の他にアルブミンを添加する必要があり試薬組成に制限がかかる。

25 このように、従来のヘモグロビン類を安定化させる方法は、ヘモグロビン類を高精度で測定する必要のある臨床検査のコントロール物質および標準物質の安定化法としては適当でない。そのため、ヘモグロビン類を含むコントロール物質および標準物質の安定化方法の開発が、医薬分野および臨床検査の分野などで求め

られている。

発明の開示

本発明者らは、コントロール物質や標準物質の安定化について研究した結果、

5 ヘモグロビン類に含硫化合物、特にSH化合物を添加することによりヘモグロビン類の安定性が向上することを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明の態様の一は、含硫化合物を含有することを特徴とするヘモグロビン類の安定化剤である。特に溶液状態のヘモグロビン類を安定化することを特徴とするヘモグロビン類の安定化剤を提供する。

10 本発明において含硫化合物はSH化合物でありうる。

さらに、本発明において、前記SH化合物が、システイン、メチオニン、もしくはシスチンなどの含硫アミノ酸またはこれらの類縁体、ならびに、チオ安息香酸、チオグリコール酸、1-チオグリセリン、チオジグリコール、メルカプトエタノール、グルタチオン、もしくはジチオスレイトールなどの含硫化合物または

15 これらの類縁体の中から選ばれる1つ以上の化合物でありうる。

本発明において、SH化合物はシステインまたはその類縁体でありうる。

また、本発明は、含硫化合物を、ヘモグロビン類の1重量部に対して0.01～0.0001重量部含有することを特徴とする。

本発明において、前記ヘモグロビン類がヘモグロビンであってよい。

20 本発明において、前記ヘモグロビン類がグリコヘモグロビンであってよい。

また、本発明の態様の一は、本発明のヘモグロビン類の安定化剤を添加することを特徴とするヘモグロビン類の安定化方法である。

さらに、本発明の態様の一は、本発明のヘモグロビン類の安定化剤を含有することを特徴とするヘモグロビン類を含む組成物である。

25 さらにまた、本発明の態様の一は、本発明のヘモグロビン類の安定化剤およびヘモグロビン類を少なくとも含んでなるキットである。

またさらに、本発明の態様の一は、本発明のヘモグロビン安定化剤における含

硫化合物の使用である。

発明を実施するための最良の形態

本発明においてヘモグロビン類とは、ヘモグロビンとグリコヘモグロビンを意味する。グリコヘモグロビンとしては、HbA_{1c}が例示される。さらに、その他、ヘモグロビン類として、HbA_{1a}、HbA_{1b}、HbF、HbA₀、HbA₂、オキシヘモグロビン、カルボニルヘモグロビン、メトヘモグロビン、シアノメトヘモグロビン、アルカリ変性ヘモグロビンなどや、その他異常ヘモグロビンが例示される。さらに、修飾ヘモグロビン類、すなわちヘモグロビン類のリン酸エスチル誘導体、ヘモグロビン-ポリアルキレン結合体、ヘモグロビン-イヌレン結合体、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体も本発明の範囲に含まれる。また、本発明は、ヒト由来に限らず種々の動物由来、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、イヌ、サル、ウサギ、ニワトリなどのヘモグロビン類についても適用可能である。これらヘモグロビン類は、各種臨床検査などのための標準物質またはコントロール物質として使用に供される。これら使用に供せられる製品は、より好ましくは凍結乾燥製剤のような乾燥製剤として提供されるが、所望により凍結製剤、液状製剤などであってもよい。

本発明のヘモグロビン類の安定化方法および安定化剤の第一義的な意義は、ヘモグロビン類の溶液状態における安定性の確保にある。その意味は、液状製剤としての、または乾燥製剤や凍結製剤の溶解時における溶液状態のヘモグロビン類の安定性を確保する事にある。

本発明のヘモグロビン類の安定化方法は、含硫化合物をヘモグロビン類の安定化のために共存させることである。含硫化合物の添加は、製剤調製時に行うことがより一般的で簡便であるが、所望により、製剤を溶解後、適宜添加することによっても目的は達成できる。製剤調製の段階で含硫化合物を添加すれば、ヘモグロビン類を主剤とし、含硫化合物を安定化剤として含む、ヘモグロビン類標準物質またはコントロール物質が提供される。また、用時添加型の製剤とするのであ

れば、主剤と含硫化合物を含む安定化剤とを別々の製剤としたキット製品として提供可能である。

含硫化合物とは、SH化合物が一般的であり、広く利用できる。SH化合物としては、システイン、メチオニン、シスチンなどの含硫アミノ酸、および、チオ安息香酸、チオグリコール酸、1-チオグリセリン、チオジグリコール、メルカプトエタノール、グルタチオン、ジチオスレイトールなどの含硫化合物、ならびにこれらの類縁体が挙げられる。これらは単独でまたは複数を組み合わせて使用できる。このなかで、好ましい化合物はシステイン、メチオニン、シスチンなどの含硫アミノ酸およびこれらの類縁体であり、特に好ましい化合物はシステインおよびその類縁体である。

含硫化合物の使用量は、ヘモグロビン類の1重量部に対して、0.01~0.0001重量部であり、好ましくは0.001~0.0001重量部である。また、溶液状態に調製した時の濃度としては、2~10重量%濃度のヘモグロビン類に対して0.01~100mM、好ましくは0.1~10mMである。

本発明において提供される安定性が確保されたヘモグロビン類を含む標準物質またはコントロール物質は、ヘモグロビン類を含有する組成物ともいえるものであり、該組成物は、そのベース成分としての主剤および安定化剤に加えて、賦形剤、溶解時の濁り防止などのためのpH調製剤、蛋白質、糖類、高分子化合物、無機塩、キレート化剤などを、所望により、公知技術を応用して、製剤調製時に配合されるかまたは用時配合されてもよい。

これらの例示としては、pHを5~9に調整しうる各種緩衝液またはpH調製剤、アルブミン、ゼラチンなどのタンパク質、グリセロール、シュークロース、好ましくはシュークロースなどの二糖類、デキストラン硫酸ナトリウム、ヘパリン、コンドロイチン硫酸ナトリウム、デキストランなどの多糖類、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリプロピレングリコールなどの高分子化合物を、単独または組み合わせて使用することができる。さらに、適宜、グルコース、マルトース、イノシトール、マンノース、フルクト

ース、グルシトール、グルコノ-δ-ラクトン、トレハロース、マルチトール、ラフィノース、マンニトールなどの糖類、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化カリウム、乳酸カルシウムなどの無機塩、E D T A (ethylenediaminetetraacetic acid)、N T A (nitrilotriacetic acid)、E D D A (ethylenediaminediacetic acid)、C y D T A (trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, monohydrate)、D P T A - O H (1,3-Diamino-2-hydroxypropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)、D T P A (Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid)、E D D P (Ethylenediamine-N,N'-dipropionic acid, dihydrochloride)、E D D P O [Ethylenediamine-N,N'-bis(methylenephosphonic acid) hemihydrate]、E G T A [ethyleneglycol-bis-(β -amino-ethylether)tetraacetic acid]、H B E D [N,N'-Bis(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N-diacetic acid]、H D T A (1,6-Hexamethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid)、H I D A [N-(2-Hydroxyethyl)iminodiacetic acid]、I D A (Iminodiacetic acid)、N T P (Nitrilotripropionic acid)、N T P O [Nitrilotris(methylenephosphonic acid), trisodium salt]、T T H A (Triethylenetetramine-N,N,N',N'',N''',N''''-hexaacetic acid)などのキレート剤、 α -、 β -、 γ -CD (cyclodextrin)、またはこれらのCDがヒドロキシルプロピル基またはジメチル基で修飾されたもの、 α -CDポリマー、 β -CDポリマー、 γ -CDポリマーなどのCD類を、単独または組み合わせて用いることができる。

20

実施例

以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

(実施例 1)

25 下記に示す試薬に安定化剤としてL-システインを1 mM添加したものおよび添加していないものを調製し、5 mlガラス容器に1 ml分注し、凍結乾燥を行い、凍結乾燥製剤とした。なお、ヘモグロビン類として、H b A_{1c}、H b A_{1a}、

HbA_{1b}、HbF、HbA₀を含むヘモグロビン標品を用い、ヘモグロビン濃度が7%になるように添加した。

10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)

5 25 mM EDTA · 2Na

7% ヘモグロビン標品 (JML社)

25% シュークロース

(試験例1)

10 実施例1で調製した、安定化剤としてL-システィンを含むおよび含まない凍結乾燥製剤をそれぞれ精製水1mlで溶解し、溶液状態で25°C 25時間経過後のヘモグロビンの安定性を比較した。ヘモグロビンの測定は、577nmにおける吸光度(O.D値)を測定することにより行った(Methods in Enzymology, 186, 265-272)。その結果、表1に示すように、
15 L-システィンの添加により、溶液状態でのヘモグロビンの充分な安定化効果が確認された。また、東ソー自動グリコヘモグロビン分析計HLC-723GHb IIIにより各画分の分析を行ったが、クロマトグラムは変化なく、各成分とも安定であった。

20 表1

	0時間	25時間後
L-システィン添加	0.86	0.85
無添加	0.86	0.41

(実施例2)

下記に示す試薬に安定化剤として、L-システィンを1mM添加したものおよ

び添加していないものを調製した。実施例1同様、HbA_{1c}、HbA_{1a}、HbA_{1b}、HbF、HbA₀を含むヘモグロビン標品を用い、ヘモグロビン濃度が7%になるように添加した。

5 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)
 25 mM EDTA · 2 Na
 7% ヘモグロビン標品 (JML社)

(試験例2)

10 実施例2で調製した、L-システインを含むおよび含まない試薬について、調製直後および25°C 25時間経過後のヘモグロビンの安定性を、試験例1と同様のヘモグロビン測定法で検討した。結果は表2に示した。L-システインの添加により、糖(シュークロース)の有無に関係なく充分なヘモグロビンの安定性が得られた。また、東ソー自動グリコヘモグロビン分析計HLC-723GHbIII
 15 により各画分の分析を行ったが、クロマトグラムは変化なく、各成分とも安定であった。

表2

	0時間	25時間後
L-システイン添加	0.85	0.85
無添加	0.85	0.43

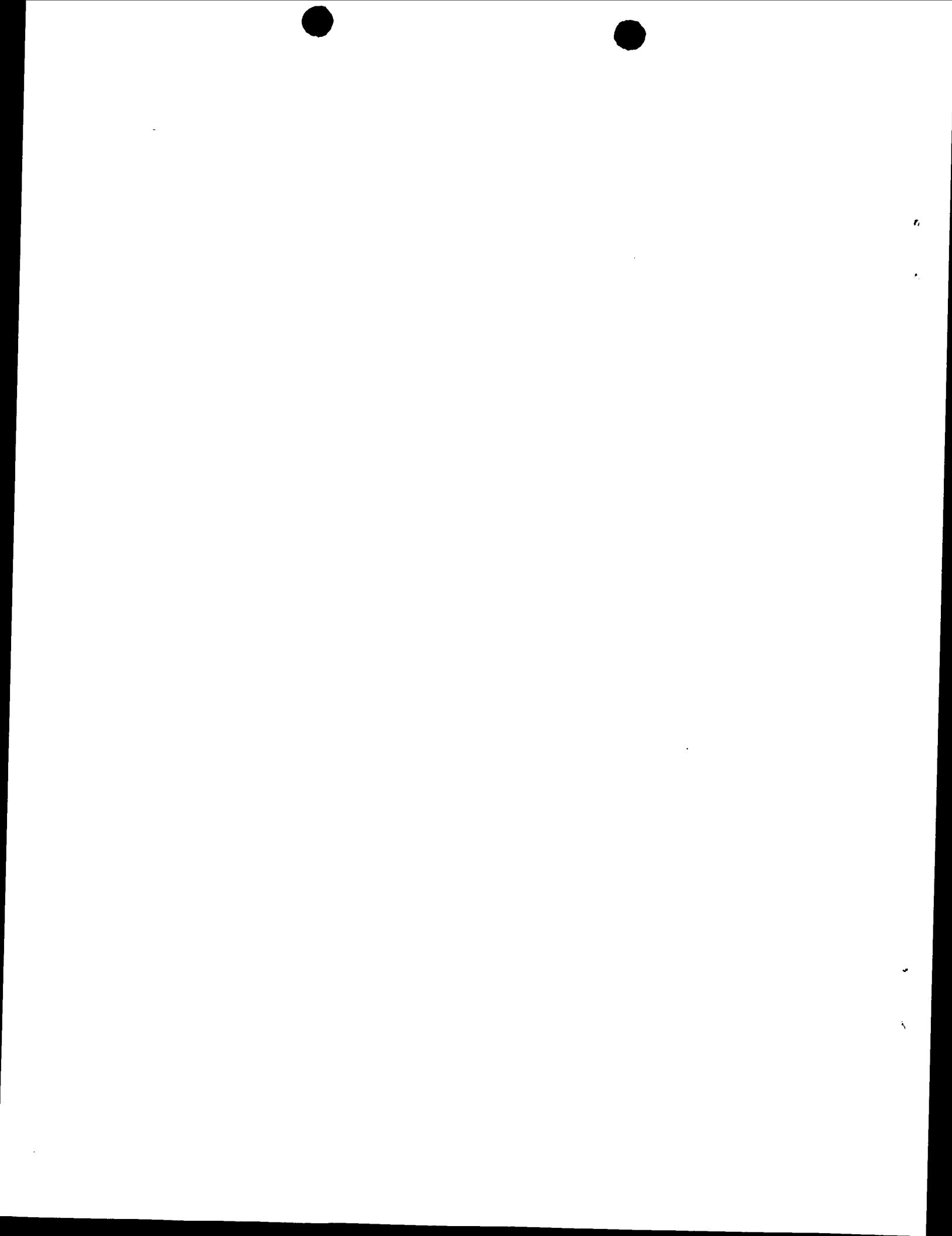
産業上の利用の可能性

本発明の含硫化合物を添加することを特徴とするヘモグロビン類の安定化方法および安定化剤により、ヘモグロビンやグリコヘモグロビンなどのヘモグロビン類の溶液状態における安定性が確保される。従って、本発明のヘモグロビン類の安定化手段を導入することにより、例えばヘモグロビン類を含む各種臨床検査などのための標準物質やコントロール物質の安定性が向上し、より確度の高い検査結果を得ることができる。このように、本発明は、臨床検査および医薬分野に寄与する有用な発明である。

請求の範囲

1. 含硫化合物を含有することを特徴とするヘモグロビン類の安定化剤。
2. 請求の範囲第1項に記載のヘモグロビン類の安定化剤であって、溶液状態のヘモグロビン類を安定化することを特徴とするヘモグロビン類の安定化剤。
- 5 3. 前記含硫化合物が、SH化合物である請求の範囲第1項または第2項に記載のヘモグロビン類の安定化剤。
4. 前記SH化合物が、システイン、メチオニン、もしくはシスチンなどの含硫アミノ酸またはこれらの類縁体、ならびに、チオ安息香酸、チオグリコール酸、1-チオグリセリン、チオジグリコール、メルカプトエタノール、グルタチオン、もしくはチオグリセロールなどの含硫化合物またはこれらの類縁体の中から選ばれる1つ以上の化合物である請求の範囲第3項に記載のヘモグロビン類の安定化剤。
10
5. 前記SH化合物がシステインまたはその類縁体である請求の範囲第3項に記載のヘモグロビン類の安定化剤。
- 15 6. 前記含硫化合物を、ヘモグロビン類の1重量部に対して0.01～0.0001重量部含有することを特徴とする請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項に記載のヘモグロビン類の安定化剤。
7. 前記ヘモグロビン類がヘモグロビンである請求の範囲第1項から第6項に記載のヘモグロビン類の安定化剤。
- 20 8. 前記ヘモグロビン類がグリコヘモグロビンである請求の範囲第1項から第6項に記載のヘモグロビン類の安定化剤。
9. 請求の範囲第1項から第8項に記載のヘモグロビン類の安定化剤を添加することを特徴とするヘモグロビン類の安定化方法。

10. 請求の範囲第1項から第8項のいずれか1項に記載のヘモグロビン類の安定化剤を含有することを特徴とするヘモグロビン類を含む組成物。
11. 請求の範囲第1項から第8項のいずれか1項に記載のヘモグロビン類の安定化剤およびヘモグロビン類を少なくとも含んでなるキット。
- 5 12. 請求の範囲第1項から第8項のいずれか1項に記載のヘモグロビン安定化剤における含硫化合物の使用。



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04440

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/805, G01N33/72, A61K38/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C07K14/805, C07K1/00-1/02, G01N33/72, A61K38/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 90/11527, A (BIONOSTICS INC), 04 October, 1990 (04.10.90) & US, 5045529, A & EP, 465510, A1 & DE, 69016415, E & JP, 4-504306, A	1-12
A	JP, 8-245421, A (International Reagents Corp.), 24 September, 1996 (24.09.96) (Family: none)	1-12

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 September, 2000 (26.09.00)Date of mailing of the international search report
10 October, 2000 (10.10.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

6

7

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int. C 17' C 07K 14/805, G 01N 33/72, A 61K 38/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int. C 17' C 07K 14/805, C 07K 1/00~1/02, G 01N 33/72, A 61K 38/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 90/11527, A (BIONOSTICS INC) 4日. 10月. 1 990 (04. 10. 90) & US, 5045529, A&EP, 465510, A1&DE, 69016415, E&JP, 4-5 04306, A	1-12
A	JP, 8-245421, A (国際試薬株式会社) 24日. 9月. 1996 (24. 09. 96) (ファミリーなし)	1-12

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 09. 00

国際調査報告の発送日

10.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

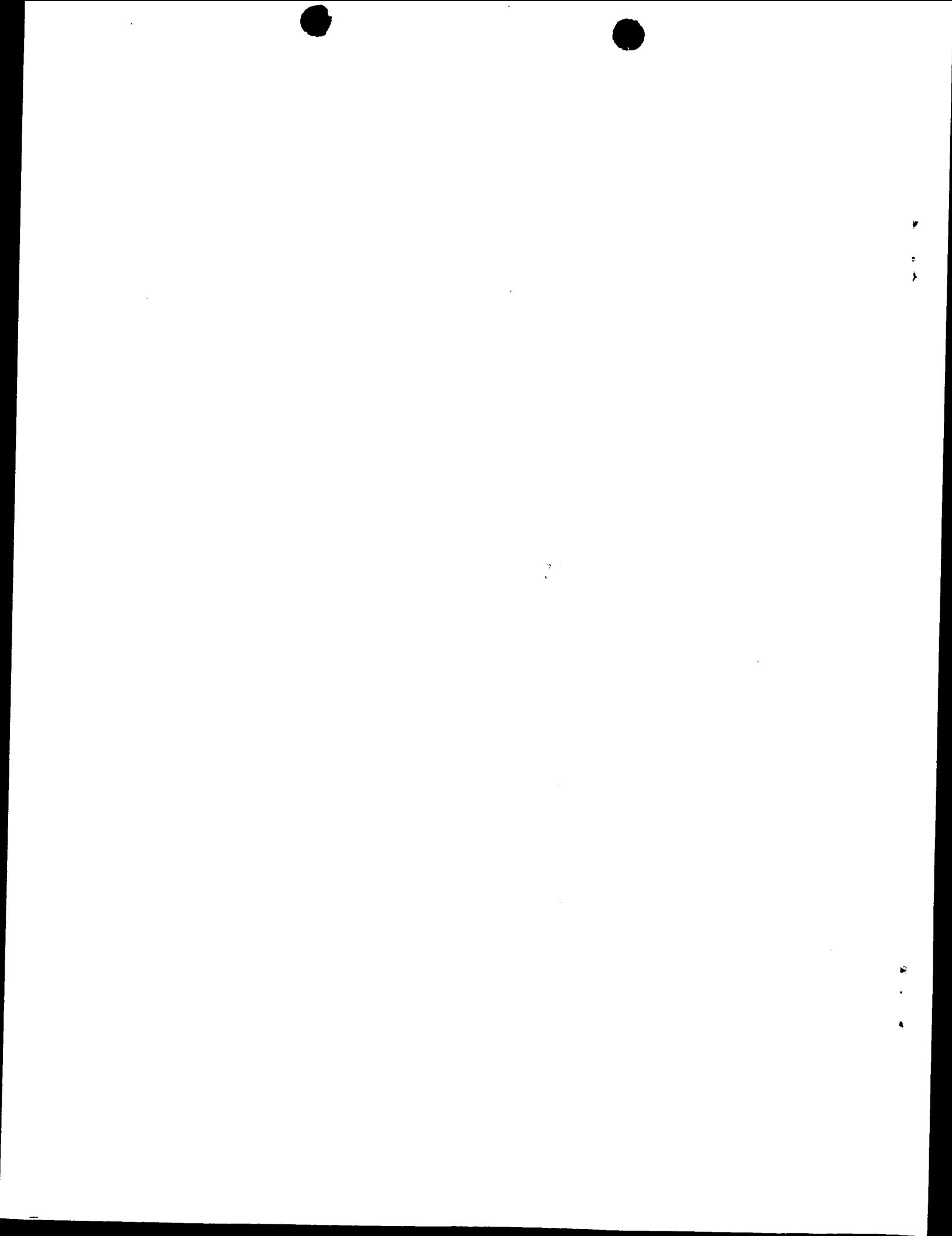
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

鈴木 恵理子

印 4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

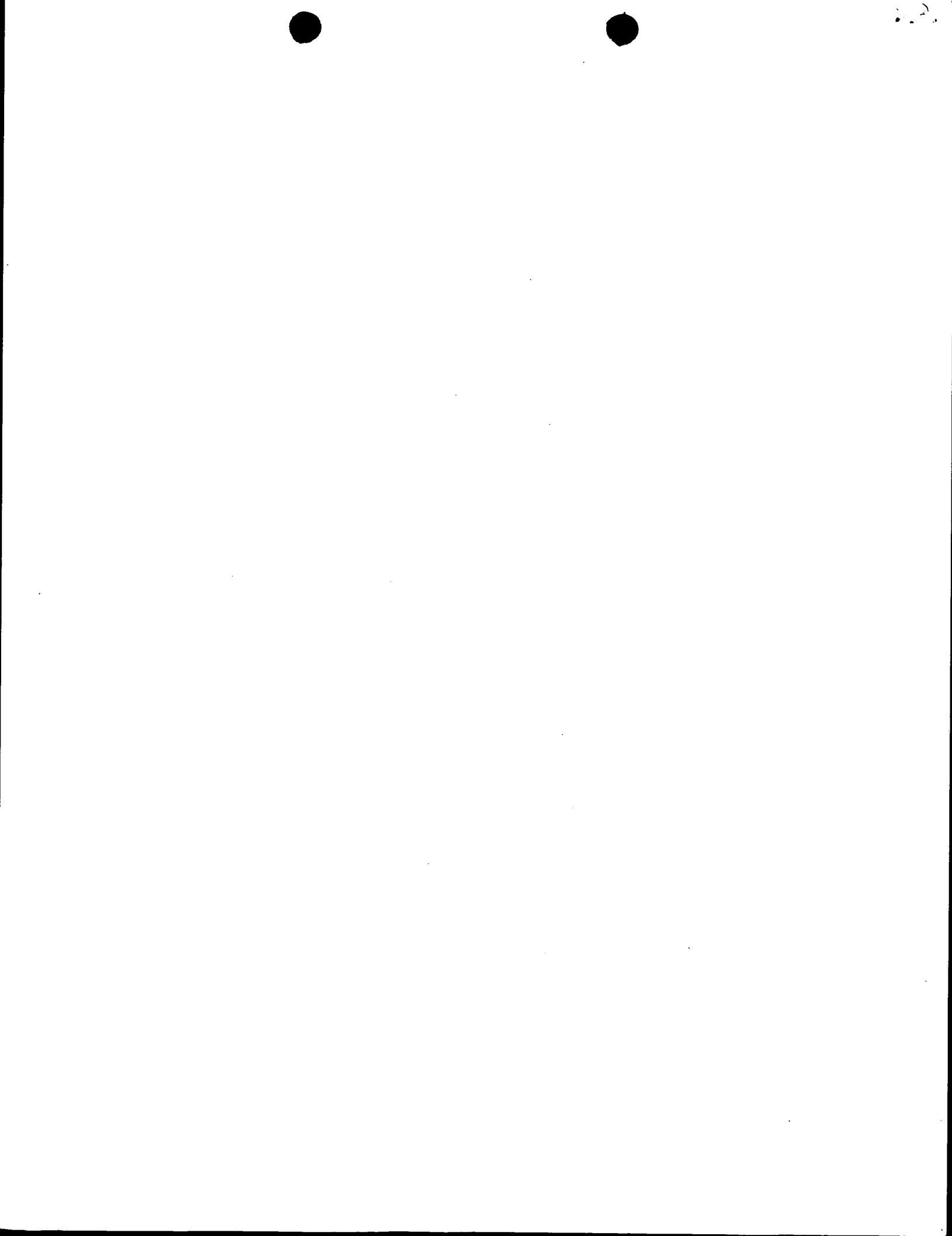
出願人又は代理人 の書類記号 G P 0 0 - 1 0 0 7	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/04440	国際出願日 (日.月.年) 03.07.00	優先日 (日.月.年) 01.07.99
出願人(氏名又は名称) 国際試薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎
 - a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 - この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
 - b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 - この国際出願に含まれる書面による配列表
 - この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 - 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。
2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
4. 発明の名称は
 - 出願人が提出したものを承認する。
 - 次に示すように国際調査機関が作成した。
5. 要約は
 - 出願人が提出したものを承認する。
 - 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。 なし
 - 出願人は図を示さなかった。
 - 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C 17 C 07K 14/805, G 01N 33/72, A 61K 38/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C 17 C 07K 14/805, C 07K 1/00~1/02, G 01N 33/72, A 61K 38/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 90/11527, A (BIONOSTICS INC) 4日. 10月. 1 990 (04. 10. 90) & US, 5045529, A&EP, 465510, A1&DE, 69016415, E&JP, 4-5 04306, A	1-12
A	JP, 8-245421, A (国際試薬株式会社) 24日. 9月. 1996 (24. 09. 96) (ファミリーなし)	1-12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 09. 00

国際調査報告の発送日

10.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

鈴木 恵理子

印 4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

